

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 10 月 24 日 (24.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/083127 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 31/41, C07D 257/04, 403/10 // A61P 3/10, 9/10, 13/12, 19/02, 25/00, 25/16, 25/28, 27/02, 27/12, 29/00, 43/00
- (74) 共通の代表者: 宮田 敏男 (MIYATA, Toshio); 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 1 6-2 5 エクセル伊勢原 1 0 2 号 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/03345
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) 国際出願日: 2002 年 4 月 3 日 (03.04.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2001-147115 2001 年 4 月 9 日 (09.04.2001) JP
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 黒川 清 (KUROKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 宮田 敏男 (MIYATA, Toshio) [JP/JP]; 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 1 6-2 5 エクセル伊勢原 1 0 2 号 Kanagawa (JP).
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROTEIN MODIFICATION-INHIBITORY COMPOSITIONS

(54) 発明の名称: 蛋白修飾物生成抑制組成物

(57) Abstract: Protein modification-inhibitory compositions which contain as the active ingredient compounds having a tetrazole group or pharmacologically acceptable salts thereof. Compounds having a tetrazole group such as angiotensin receptor blockers are useful in inhibiting protein modification with carbonyl compounds caused by hyperglycemia or oxidation stress. These protein modification inhibitors are free from side effects such as vitamin B6 deficiency.

(57) 要約:

テトラゾール基を有する化合物または薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分とする蛋白修飾物生成抑制剤が提供される。アンジオテンシン受容体ブロッカー等のテトラゾール基を有する化合物は、高血糖や酸化ストレスに起因する、カルボニル化合物による蛋白質修飾の抑制に有用である。本発明の蛋白修飾物生成抑制剤は、ビタミン B 6 欠乏症などの副作用を伴わない。

- 1 -

明細書

蛋白修飾物生成抑制組成物

技術分野

この発明は、蛋白修飾物生成抑制組成物に関する。更に詳しくは、非酵素的条件下にカルボニル化合物と反応することによって生じる糖化最終産物 (Advanced Glycation End Products、以下、「AGEs」と称する)、脂質過酸化最終産物 (Advanced Lipoxidation End Products、以下、「ALEs」と称する) 等の蛋白修飾物の生成を抑制する組成物に関する。

背景技術

糖化反応 (グリケーション) とは、ペプチドや蛋白質等のアミノ基と還元糖等のカルボニル基との非酵素的反応から始まる一連の反応 (メイラード反応 (Maillard, L. C.; Compt. Rend. Soc. Biol., 72, 599, 1912)) をいう。この反応は、初期段階と後期段階に大別することができる。

初期段階は、糖の濃度と反応時間とに依存する可逆反応である。この段階において、前記アミノ基と前記カルボニル基とが非酵素的に反応して Schiff 塩基を生成し、さらにアマドリ転位によりアマドリ化合物を形成する。後期段階では初期段階で生成したアマドリ化合物が非可逆的に脱水、縮合、環状化、酸化、断片化、重合、転位等を受け、最終的に AGEs と呼ばれる蛋白修飾物を形成する。

また糖の自動酸化等によって、3-デオキシグルコソン (以下、「3-DG」と称する)、グリオキサールおよびメチルグリオキサール (以下、「MG」と称する) 等の反応性の高いジカルボニル化合物が生成する。これらのカルボニル化合物も蛋白質と反応し、多くの場合、蛋白質のリジン残基やアルギニン残基等が修飾された AGEs を生成する。

また、酸化ストレス下では、生体内に豊富に存在する糖、脂質、アミノ酸等は酸化反応等により、反応性の高いカルボニル化合物へと変化する。その結果生じる、グリオキサル、メチルグリオキサル、アラビノース、グリコールアルデヒドなどの化合物はAGEsの前駆物質となる。更にアスコルビン酸の酸化により生成するデヒドロアスコルビン酸もAGEsの前駆物質となる。これらの前駆物質はいずれもカルボニル基を有しており、蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応してシッフ塩基を生成してAGEsを形成する (Miyata, T. et al.; *Kidney Int.*, 55, 389-399, 1999)。

一方、酸化ストレス下では脂質過酸化も進行し、マロンジアルデヒド、ヒドロキシノネナールおよびアクロレインのような、様々なカルボニル化合物が形成される (Esterbauer, H. et al.; *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 81-128, 1991、Uchida, K. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4882-4887, 1998)。これらのカルボニル化合物も蛋白質のアミノ基等と反応し、マロンジアルデヒド修飾リジンやヒドロキシノネナール修飾物等のALEsと呼ばれる蛋白修飾物を形成する (Miyata, T. et al.; *Kidney Int.*, 55, 389-399, 1999、Miyata, T. et al.; *Nephrol. Dial. Transplant.*, 12, 255-258, 1997、Miyata, T. et al.; *Kidney Int.*, 51, 1170-1181, 1997)。

更に、セリンやスレオニンなどのアミノ酸も酸化によりアクロレイン、グリオキサルなどのカルボニル化合物が生成し、蛋白修飾物を形成する (Anderson, M. M. et al.; *J. Clin. Invest.*, 99, 424-432, 1997)。多くのカルボニル化合物は酸化的経路で生成されるが、3-DGのように非酸化的経路を経て生成されるカルボニル化合物も存在する。

公知のAGEs生成経路として、次のような経路が知られている。

- 1) シッフ塩基、アマドリ化合物から3-DGを経由する経路、
- 2) シッフ塩基が酸化的にグリコールアルデヒド-アルキルイミンへ変化し、アルドアミンを経てAGEsに至る経路、

- 3) アルドアミンがグリオキサールモノアルキルイミンを経てAGEsに至る経路、
- 4) アマドリ化合物から2, 3-エンジオールを経て生成されるメチルグリオキサールを中間体とする経路、
- 5) その他

最近、AGEsの1つであるカルボキシメチルリジンが不飽和脂肪酸の脂質酸化反応の結果生じるグリオキサールによって第3経路を介して生成することが明らかにされた。つまり、糖化・酸化反応と脂質酸化反応が、共通の基盤で起きていると考えられる。

以上のように、糖、脂質、アミノ酸およびアスコルビン酸から酸化的、非酸化的経路により生成されたカルボニル化合物は、蛋白を非酵素的に修飾して最終的にAGEsやALEs等の蛋白修飾物を形成するに至る。特に、複数の反応経路を経て生成されたカルボニル化合物により蛋白修飾反応が亢進している状態をカルボニル過剰による蛋白修飾、すなわち、カルボニルストレスと呼んでいる。

公知のAGEsとしては、ペントシジン (Sell, D. R. et al. ; J. Biol. Chem., 264, 21597-21602, 1989)、クロスリン (Nakamura, K. et al. ; J. Chem. Soc. Chem. Commun., 15, 992-994, 1992、Ienaga, K. et al. ; Contrib. Nephrol., 112, 42-51, 1995、Hirata, C. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 236, 712-715, 1997)、X1 (フルオロリンク)、ピロピリジン (Hayase, F. et al. ; Biosci. Biotech. Biochem., 58, 1936-1937, 1994)、ピラリン (Njoroge, F. G. et al. ; Carbohydr. Res., 167, 211-220, 1987、Hayase, F. et al. ; J. Biol. Chem., 264, 3758-3764, 1989、Miyata, S. et al. ; J. Clin. Invest., 89, 1102-1112, 1992)、カルボキシメチルリジン (Ahmed, M. U. et al. ; J. Biol. Chem., 261, 4889-4894, 1986)、イミダゾロン化合物 (Hayase, F. et al. ; Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1407-1411, 1995、Uchida, K. et al. ; FEBS Lett., 410, 313-318, 1997)、カルボキシエチルリジン (Ahmed, M. U. et al. ; Biochem. J., 324, 565-5

70, 1997)、メチルグリオキサールダイマー (Brinkmann, E. et al.; J. Chem. Soc. Perkin. Trans., 2, 1-2, 1995、Wells-Knecht, K. J. et al.; Nephrol. Dial. Transplant., 11(Suppl. 5), 41-47, 1996)、グリオキサールダイマー (Well-Knecht, K. J. et al.; J. Org. Chem., 60, 6246-6247, 1995、Wells-Knecht, K. J. et al.; Nephrol. Dial. Transplant., 11(Suppl. 5), 41-47, 1996)、イミダゾリジン (Nagaraj, R. H. et al.; J. Biol. Chem., 271, 19338-19345, 1996) およびアルグピリミジン (Shipanova, I. N. et al.; Arch. Biochem. Biophys., 334, 29-36, 1997) 等が知られている。

現在クローニングされているAGEs受容体として、RAGE (Neeper, M. et al.; J. Biol. Chem., 267, 14998-15004, 1992、Schmit, A. M. et al.; J. Biol. Chem., 267, 14987-14997, 1992)、マクロファージスカベンジャー受容体クラスA (Suzuki, H. et al.; Nature, 386, 292-295, 1997、Komada, T. et al.; Nature, 343, 531-535, 1990)、ガレクチン3 (Vlassara, H. et al.; Molecular Medicine, 1, 634-646, 1995)、OST-48および80K-H等がある (Suzuki, H. et al.; Nature, 386, 292-295, 1997、Vlassara, H. et al.; Molecular Medicine, 1, 634-646, 1995)。

RAGEは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜貫通型蛋白質である。血管組織においてAGEsがRAGEに結合すると、細胞内で活性酸素が生成し、p21ras/MAPK経路が活性化される (Lander, H. M. et al.; J. Biol. Chem., 272(28), 17810-17814, 1997)。これにより転写因子NF- κ B活性化が誘導され、VCAM-1等の血管障害関連因子の発現が誘導されることが報告されている (Chappey, O. et al.; Eur. J. Clin. Invest., 27, 97-108, 1997、Lander, H. M. et al.; J. Biol. Chem., 272, 17810-17814, 1997)。

また、AGEsはRAGEを介して、微小血管の内皮細胞の増殖を制御し、恒常性維持に重要な役割を果たしている周皮細胞の増殖を抑制するとともに、毒性効果を発揮することが報告されている (Yamagishi, S. et al.; Biochem. Biophys.

s. Res. Commun., 213, 681-687, 1995)。さらに、AGEsはRAGEを介して、微小血管の内皮細胞に直接的に作用し血管新生を促進すること、PGI₂の産生を阻害して血栓傾向となること (Yamagishi, S. et al. ; FEBS Lett., 384, 103-106, 1996) が報告されている。

その他、AGEsやALEs等の生理活性として、メサンギウム細胞の基質産生の亢進、単球遊走能の亢進、マクロファージからの炎症性サイトカインの放出、滑膜細胞のコラゲナーゼ産生促進、破骨細胞の活性化、血管平滑筋の増殖作用、血小板凝集の促進、NO活性とその平滑筋弛緩反応の抑制が報告されている (Doi, T. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 2873-2877, 1992、Miyata, T. et al. ; J. Am. Soc. Nephrol., 9, 1723-1735, 1998、Miyata, T. et al. ; J. Clin. Invest., 93, 521-528, 1994、Iida, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 1235-1241, 1994、Miyata, T. et al. ; J. Clin. Invest., 98, 1088-1094, 1996、Satoh, H. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 111-115, 1997、Hangaishi, M. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 248, 285-292, 1998、Miyata, T. et al. ; J. Am. Soc. Nephrol., 8, 260-270, 1997)。

AGEsが関与する疾患として、たとえば次のような疾患が報告されている。

- 1) 糖尿病合併症である腎症 (Horie, K. et al. ; J. Clin. Invest., 100(12), 2995-3004, 1997、Makino, H. et al. ; Kidney Int., 48(2), 517-526, 1995、Miyata, S. et al. ; J. Clin. Invest., 89(4), 1102-1112, 1992、Niwa, T. et al. ; J. Clin. Invest., 99(6), 1102-1112, 1997)、神経障害 (Sugimoto, K. et al. ; Diabetologia, 40(12), 1380-1387, 1997)、網膜症 (Lu, M. et al. ; J. Clin. Invest., 101(6), 1219-1224、Yamagishi, S. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 213(2), 681-687, 1995)、および白内障、
- 2) 動脈硬化 (Park, L. et al. ; Nat. Med., 4(9), 1025-1031, 1998、Wang, X. Y. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(13), 7643-7647, 1998、Bucala, R. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9441-9445, 1994、Kume, S. et al. ;

- Am. J. Pathol., 147, 654-667, 1995) 、
- 3) 透析合併症である透析アミロイドーシス (Miyata, T. et al. ; J. Clin. Invest., 92, 1243-1252, 1993、Miyata, T. et al. ; J. Clin. Invest., 93, 521-528, 1994、Miyata, T. et al. ; Kidney Int., 49, 538-550, 1996、Iida, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 201, 1235-1241, 1994、Miyata, T. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2353-2358, 1996、Miyata, T. et al. ; Biochemistry, 33, 12215-12221, 1994) 、および腹膜透析患者における腹膜硬化症、
- 4) 中枢神経疾患であるアルツハイマー病 (Smith, M. A. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(12), 5710-5714, 1994、Yan, S. D. et al. ; Nature, 382, 685-691, 1996、Kimura, T. et al. ; Neurosci. Lett., 219, 95-98, 1996、Horie, K. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 236, 327-332, 1997) 、ピック病およびパーキンソン病、
- 5) リウマチ性関節炎 (Miyata, T. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 244, 45-49, 1999) 、
- 6) 日光弾性線維症、
- 7) 老化、
- 8) 腎不全 (Makita, Z. et al. ; N. Engl. J. Med., 325, 836-842, 1991、Miyata, T. et al. ; J. Clin. Invest., 92, 1243-1252, 1993) 等

その他、糖尿病の場合、血管内皮由来の血管拡張がAGEsによって障害されること (Bucala, R. et al. ; J. Clin. Invest., 87, 432-438, 1991) 、AGEsが腎硬化を促進させること (Vlassara, H. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 11704-11708, 1994) 等が報告されている。

以上のことから、AGEsを初めとする蛋白修飾物は、直接的にまたは受容体を介して生体に悪影響を与えることが明らかとなっている。

一方、腎機能が低下するに従って、血中のAGEsの濃度が上昇することが知

られている。腎機能低下により、分子量 5 kDa 以下と考えられるカルボニル化合物は体内に蓄積する。ペントシジンやピラリン等の場合、遊離型も存在するが、血清アルブミン等の蛋白結合型が大部分を占めている (Miyata, T. et al. ; J. Am. Soc. Nephrol., 7, 1198-1206, 1996、Miyata, T. et al. ; Kidney Int., 54, 1290-1295, 1999、Miyata, T. et al. ; Kidney Int., 51, 880-887, 1997、Odani, H. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 224, 237-241, 1996)。

また、血中ペントシジン濃度は糸球体濾過機能の影響を強く受けるという報告がある (Sugiyama, S. et al. ; J. Am. Soc. Nephrol., 9, 1681-1688, 1998、Jadoul, M. et al. ; Kidney Int., 55, 2487-2492, 1999)。この様に、AGEs はその大部分が腎において処理され、健康時には血中濃度は低く保たれている。しかし腎機能が低下すると AGEs が蓄積し尿毒症毒素 (uremic toxin) として慢性の生物活性をもたらすようになる。

透析療法によって遊離型の AGEs は除去されるが、蛋白結合型のものや分子内架橋を形成するものは除去することは困難である (Miyata, T. et al. ; Kidney Int., 49, 1304-1313, 1996)。従って、腎不全期間の経過と共に蛋白修飾物の生体内蓄積量は増加する。また生体内で糖が反応する基本的な過程以外に、食品から摂取される遊離型 AGEs や、生体内で既に形成されたアマトリ化合物などから形成される活性の強い 3-DG、グリオキサール、MG などの中間体が次々に蛋白と反応し、AGEs の産生を促進することが認められている。

また、血液は透析膜と接触することによって、補体系や白血球の活性化などの様々な影響を受け、フリーラジカルの産生亢進へとつながる等、透析療法そのものによる酸化の亢進も存在し、AGEs 生成の一因となっている。ゆえに、透析療法での対策としては、透析導入の初期からこれらの遊離型物質の除去を図り、結合型の AGEs 形成を極力抑制することが重要である。上記のように結合型の AGEs を透析療法によって除去することは困難であるので、透析療法では蛋白修飾物の生成を抑制する薬物の開発が希求されている。

また、腎機能に起因するばかりではなく、腎不全に伴う抗酸化防御機構の低下も蛋白修飾物の蓄積に関与していると考えられる。腎不全患者では、血中還元型グルタチオンに対する酸化型グルタチオンの上昇 (Canestrari, F. et al. ; *Acta Haematol.*, 91, 187-193, 1994)、グルタチオン依存酵素群の活性低下、保存期腎不全血漿グルタチオンペルオキシダーゼの低下 (Ueda, Y. et al. ; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 785-790, 1998)、全血中グルタチオンの低下 (Canestrari, F. et al. ; *Acta Haematol.*, 91, 187-193, 1994)、ならびに血漿セレン濃度の低下に対する血漿スーパーオキシドジスムターゼの活性上昇 (Richard, M. J. et al. ; *Nephron*, 57, 10-15, 1991) といった抗酸化能の不均衡が示唆されている (Jadoul, M. et al. ; *Kidney Int.*, 55, 2487-2492, 1999)。

また、一般に慢性腎不全の患者では、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGEsが著しく蓄積していることが報告されている (Miyata, T. et al. ; *Kidney Int.*, 51, 1170-1181, 1997、Miyata, T. et al. ; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7, 1198-1206, 1996、Miyata, T. et al. ; *Kidney Int.*, 54, 1290-1295, 1998、Miyata, T. et al. ; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 9, 2349-2356, 1998)。腎不全においては、非酵素的化学反応によりカルボニル化合物が高負荷の状態 (カルボニルストレス) となり、蛋白質修飾が亢進される病態が存在しており、糖・脂質からカルボニル化合物が生成され蛋白質を修飾するためであると考えられる (Miyata, T. et al. ; *Kidney Int.*, 55, 389-399, 1999)。ゆえに、様々な要因によって生じる蛋白修飾物の生成を抑制することが、組織障害の軽減につながり、AGEs等の蛋白修飾物質が関与する病態を予防および治療することができる。

慢性腎不全患者に行われる透析には、血液透析と腹膜透析がある。腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液 (グルコース、イコデキストリンまたはアミノ酸等を含有する) は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物を、腹膜を介して腹腔内

の腹膜透析液中に集める作用がある。腎不全患者の血中には、酸化ストレスに伴って、たとえば次のようなカルボニル化合物が蓄積する。

炭水化物に由来するカルボニル化合物（アラビノース、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコゾン）、

アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物（デヒドロアスコルビン酸）、

脂質に由来するカルボニル化合物（ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒド、アクロレイン）

また、腹膜透析液の滅菌や保存中に、反応性の高いカルボニル化合物が腹膜透析液中に生成することが知られている（Richard, J. U. et al. ; *Fund. Appl. Toxicol.*, 4, 843-853, 1984）。腹膜透析液中に生成するカルボニル化合物としては、3-デオキシグルコゾン、5-ヒドロキシメチルフルフラール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、グリオキサール、メチルグリオキサール、レブリン酸、フルフラール、アラビノース等を示すことができる。

そのため腹膜透析液中の前記カルボニル化合物濃度は上昇し、蛋白修飾物質の生成が亢進する。その結果、腹膜の機能が低下し、除水能の低下や腹膜硬化症への進展に関与すると考えられる（Miyata, T. et al. ; *Kidney Int.*, 58, 425-435, 2000、Inagi, R. et al. ; *FEBS Lett.*, 463, 260-264, 1999、Combet, S. et al. ; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 717-728, 2000）。

実際に腹膜透析患者においては、導入されたグルコースによって腹腔内がカルボニルストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明されている（Yamada, K. et al. ; *Clin. Nephrol.*, 42, 354-361, 1994、Nakayama, M. et al. ; *Kidney Int.*, 51, 182-186, 1997、Miyata, T. et al. ; *Kidney Int.*, 58, 425-435, 2000、Inagi, R. et al. ; *FEBS Lett.*, 463, 260-264, 1999、Combet, S. et al. ; *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11, 717-728, 2000）。この様に、透析患者においてもカルボニル化合物による蛋白修飾物の生成が腹膜の形態学的変化およびこれに伴う機能(除水能)の低下の原因となっていることが推測されており、

その改善方法の提供が求められている。

以上の事実と腎不全をはじめとする種々の病態を考え合わせると、カルボニル化合物蓄積がAGEs 産生亢進の原因の1つであると考えられる (Miyata, T. et al. ; Nephrol. Dial. Transplant., 12, 255-258, 1997、Miyata, T. et al. ; Kidney Int., 51, 1170-1181, 1997) 。したがって、AGEs の産生を抑制することが、AGEs が関連する病態に対し有効であると考えられる。

代表的なAGEs 生成阻害薬としてアミノグアニジンがある。アミノグアニジンはグルコース、シッフ塩基やアマドリ生成物から生成される3-DGなどのジカルボニル化合物と反応してチアゾリンを形成することによってAGEs 生成を阻害すると考えられている。糖尿病モデル動物を用いた解析では、糖尿病性腎症 (Edelstein, D. et al. ; Diabetologia, 35, 96-101, 1992) 、網膜症 (Hammes, H. P. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 11555-11561, 1991) および白内障 (Matsumoto, K. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 241, 352-354, 1997) の進展を遅延させる効果が確認されている。

他に、この種に属する化合物としてピリドキサミン誘導体 (ピリドリン) がある。また、OPB-9195 ((±) 2-イソプロピリデンヒドラゾノ-4-オキソ-チアゾリン-5-イルアセトアニリド) はヒドラジンの窒素原子がカルボニル基と反応して安定な構造を形成し、遊離または蛋白に結合した反応性カルボニルを捕捉することにより (Nakamura, S. et al. ; Diabetes, 46, 895-899, 1997) 、in vitroでAGEs のみならずALEs の生成も抑制する。

メトホルミンやブホルミン等のビグアナイド化合物もカルボニル化合物を捕捉できるため、(Beisswenger, P. J. et al. ; Diabetes, 48, 198-202, 1999) AGEs 生成阻害薬として利用できる可能性がある。さらに、AGEs の特徴である架橋を切断するタイプのAGEs 阻害剤、アマドリ化合物を分解する酵素 (amadoriase) 等の提案もされている。

一方、カルボニル化合物を消去することにより、AGEs やALEs の生成を

- 1 1 -

阻害する可能性も検討されている。カルボニル化合物の消去にはいくつかの酵素や酵素的経路が存在する。例えばアルドース還元酵素、アルデヒドデヒドロゲナーゼやグリオキサラーゼ経路が、酵素的経路として挙げられる (Thornalley, P. J. et al. ; *Endocrinol. Metab.*, 3, 149-166, 1996)。還元型グルタチオン (GSH) やNAD(P)Hなどのレドックス補酵素は、これらの経路の活性に重要な要素である。これらの消去系の低下は同時に多数のカルボニル化合物の上昇につながる。メチルグリオキサール、グリオキサールなどのカルボニル化合物はGSHのチオール基と反応し、結果的にグリオキサラーゼにより代謝される。NAD(P)Hはグルタチオン還元酵素を活性化し、GSHレベルを上昇させる。すなわち、細胞内レドックス機構の不均衡によるGSHおよびNAD(P)Hの低下によりカルボニル化合物の消去系が阻害され、AGEsやALEsの蓄積につながると考えられる。

また、糖尿病においては、高血糖によりポリオール経路が活性化され、NAD(P)HやGSHが低下し、結果的にカルボニル化合物の消去系が低下することが示唆される。前述したようにGSHおよびNAD(P)Hなどのチオール濃度の低下がカルボニル化合物消去の低下につながり、結果としてAGEsやALEsを形成する原因の1つとなっているとすれば、チオールレベルを上昇させることによりカルボニル化合物を減少できる可能性がある。

そのためには、GSH、システイン、アセチルシステイン等によりチオール基を補充する方法、ビタミンEやユビキノール等によりGSH需要を低下させる方法、アルドース還元酵素阻害薬等によりポリオール系を阻害する方法が提案されている。さらに、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、ビグアナイド化合物およびSH基含有化合物を用いて、カルボニル化合物をトラップさせる方法も提案されている (WO 00/10606)。

以上詳細に述べたように、AGEsおよびALEsの生成を阻害することが、これらに関連する病態を予防または治療できる方法である。

- 1 2 -

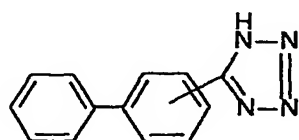
発明の開示

本発明は上記従来技術に鑑みて行われたものであり、本発明の目的は、効果的にAGEs、ALEs等の蛋白修飾物の生成を抑制する蛋白修飾物生成抑制剤を提供することである。

本発明者らは、非酵素的条件下、蛋白質とカルボニル化合物との反応によって生じる蛋白修飾物が関与する病態の予防および／または治療に有用な化合物を見出すために鋭意研究した。その結果、テトラゾール基を有する化合物が蛋白修飾物の生成を阻害する作用を有することを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、以下の蛋白修飾物生成抑制剤、およびその用途に関する。

- 〔1〕 テトラゾール基を有する化合物または薬理学的に許容されるそれらの塩である蛋白修飾物生成抑制剤。
- 〔2〕 化合物が（式1）の一般式で示すビフェニルテトラゾール基を有する化合物または薬理学的に許容されるそれらの塩である〔1〕記載の蛋白修飾物生成抑制剤。



（式1）

- 〔3〕 化合物がアンジオテンシン受容体ブロッカーである〔1〕または〔2〕記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
- 〔4〕 アンジオテンシン受容体ブロッカーが、オルメサルタン、バルサルタン、ロサルタン、カンデサルタンシレキセチル、および薬理学的に許容されるそれらの塩で構成される群から選択された少なくとも1つの化合物である〔3〕記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
- 〔5〕 蛋白修飾物が、糖化最終産物、および／または脂質過酸化最終産物である〔1〕に記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
- 〔6〕 蛋白修飾物が糖化最終産物である〔5〕記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

- 13 -

- 〔7〕 糖化最終産物がペントシジンである〔6〕記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
- 〔8〕 〔1〕乃至〔10〕の何れかに記載の蛋白修飾物生成抑制剤またはそれらの組合せを有効成分として含む蛋白修飾物生成抑制組成物。
- 〔9〕 〔1〕乃至〔10〕の何れかの蛋白修飾物生成抑制剤またはそれらの組合せが固定化された担体。
- 〔10〕 〔9〕に記載の担体を含む蛋白修飾物生成抑制組成物。
- 〔11〕 腹膜透析に於いて蛋白修飾物の生成を抑制するための〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物。
- 〔12〕 血液透析に於いて蛋白修飾物の生成を抑制するための〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物。
- 〔13〕 〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを含む腹膜透析液。
- 〔14〕 〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを含むことを特徴とする血液透析液。
- 〔15〕 〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを液体試料と接触させる工程を含む、液体試料のカルボニル化合物含有量を低減させる方法。
- 〔16〕 〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを、患者血液または腹膜透析液と接触させる工程を含む蛋白修飾物の生成抑制方法。
- 〔17〕 〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せが充填された蛋白修飾物生成抑制用カートリッジ。
- 〔18〕 〔8〕または〔10〕に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せが充填された、腹膜透析用または血液透析用の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジ。
- 〔19〕 〔17〕に記載の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに腹膜透析液を導

入する工程と、該カートリッジから腹膜透析液を回収する工程とを含むカルボニル化合物含有量を低減させた腹膜透析液の調製方法。

〔20〕〔17〕に記載の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに血液透析液を導入する工程と、該カートリッジから血液透析液を回収する工程とを含むカルボニル化合物含有量を低減させた血液透析液の調製方法。

また本発明は、テトラゾール基を有する化合物または薬理的に許容されるそれらの塩を投与する工程を含む、蛋白質修飾に起因する疾患の予防／およびまたは治療方法に関する。あるいは本発明は、テトラゾール基を有する化合物または薬理的に許容されるそれらの塩の、蛋白質修飾に起因する疾患の予防／およびまたは治療用医薬組成物の製造における使用に関する。

上記薬剤あるいは方法において、前記蛋白修飾物はAGEs、ALEsまたはこれらの組合せであってもよく、またAGEsはペントシジンであってもよい。

本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、上記何れかの蛋白修飾物生成抑制剤またはそれらの組合せを有効成分として含むことを特徴とする。

また、本発明における担体は、上記何れかの蛋白修飾物生成抑制剤またはそれらの組合せを固定化するための不溶性担体をいう。本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、このように担体に固定化されていてもよい。

本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、腹膜透析における蛋白修飾物の生成の抑制、あるいは血液透析における蛋白修飾物の生成の抑制に用いることができる。

本発明の腹膜透析液は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを含んでいることを特徴とし、本発明の血液透析液は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物を含んでいることを特徴とする。

本発明の液体試料のカルボニル化合物含有量を低減させる方法は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを液体試料と接触させる工程を含んでいることを特徴とする。

また、本発明の蛋白修飾物の生成抑制方法は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物

またはそれらの組合せを、患者血液または腹膜透析液と接触させる工程を含んでいることを特徴とする。

本発明の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジは、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せが充填されたことを特徴とする。この蛋白修飾物生成抑制用カートリッジは、腹膜透析用または血液透析用として適している。

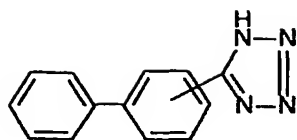
本発明のカルボニル化合物含有量を低減させた腹膜透析液の調製方法は、上記蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに腹膜透析液を導入する工程と、該カートリッジから腹膜透析液を回収する工程とを含むことを特徴とする。

また、カルボニル化合物含有量を低減させた血液透析液の調製方法は、上記蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに血液透析液を導入する工程と、該カートリッジから血液透析液を回収する工程とを含むことを特徴とする。

本明細書において「蛋白修飾物」とは、非酵素的条件下にカルボニル化合物と反応することによって生じる蛋白修飾物をいう。具体的には、例えば、AGEs、ALEs等が蛋白修飾物に含まれる。本発明において蛋白修飾物は、特記しない限りAGEsとALEsの両者を含むものとする。前記蛋白修飾物はAGEs、ALEsまたはこれらの組合せであってもよい。例えば、AGEsには、ペントシジン、クロスリン、X1（フルオロリンク）、ピロピリジン、ピラリン、カルボキシメチルリジン、イミダゾロン化合物、カルボキシエチルリジン、メチルグリオキサールダイマー、グリオキサールダイマー、イミダゾリジン、アルグピリミジン等が含まれる。ALEsには、マロンジアルデヒドリジンやヒドロキシノネナール修飾物等が含まれる。

本明細書に於ける「蛋白修飾物生成抑制組成物」は、テトラゾール基を有する化合物を含み、*in vivo*、*ex vivo* および／または *in vitro* に拘わらず、蛋白修飾物の生成を結果的に抑制する組成物である。特に、式1に示すビフェニルテトラゾール基を有する化合物が好適に用いられる。

- 16 -

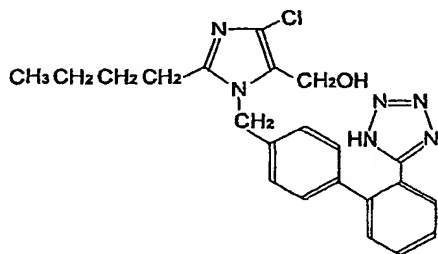


(式1)

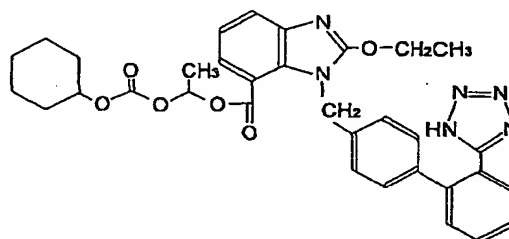
とりわけビフェニルテトラゾール基を主骨格とするアンジオテンシン受容体ブロッカーを用いるのが好ましい。ここで、「アンジオテンシン受容体ブロッカー」とは、アンジオテンシン受容体において競合的または非競合的な拮抗作用を示すことによりその作用を発揮する化合物を意味する。アンジオテンシン受容体にはいくつかのサブタイプが知られているが、いずれの受容体であってもよい。

かかるアンジオテンシン受容体ブロッカーの例としては、ロサルタン、カンデサルタンシレキセチル、バルサルタン、テルミサルタン、イルベサルタン、エプロサルタン、タソサルタン、フォラサルタン、オルメサルタン、リピサルタン、ミルファサルタン、エンブサルタン、KRH-594、KD-3-671、TAK-536、TA-606などを挙げることができる。以下に、ロサルタン、カンデサルタンシレキセチル、バルサルタン、およびオルメサルタンの化学構造式を示す。

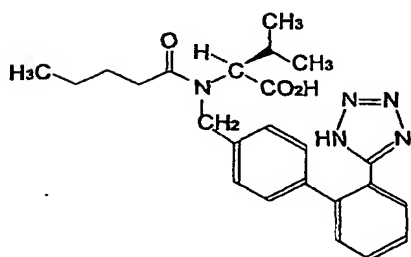
・ロサルタン



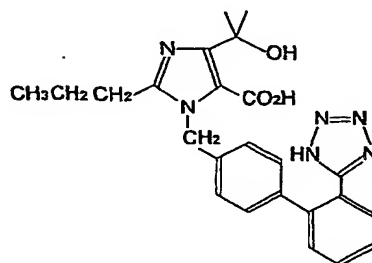
・カンデサルタンシレキセチル



・バルサルタン



・オルメサルタン



これらのアンジオテンシン受容体ブロッカーは、活性体または前駆体のいずれであってもよい。また、「結果的に抑制する」とは、カルボニル化合物をトラップする作用を有することによるものであってもよく、蛋白修飾物を生成する反応を抑制することによるものであってもよく、最終的に蛋白修飾物の生成を抑制すればよく、その作用機序には限定されない。

本明細書に於ける「カルボニル化合物」とは、生体由来または非生体由来に関係なく、カルボニル基を有する化合物であればよく、ジカルボニル化合物も含まれる。カルボニル化合物には、アラビノース、グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコゾン、グリコールアルデヒド、デヒドロアスコルビン酸、ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒド、アクロレイン、5-ヒドロキシメチルフルフラール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、レプリン酸、フルフラール等が含まれる。

本発明による蛋白修飾物生成抑制組成物は、前記テトラゾール基を有する化合物を有効成分として含有する。本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、本発明の何れかの蛋白修飾物生成抑制剤、またはそれらの組合せを有効成分として含むことを特徴とする。本発明の、蛋白修飾物が関与する病態を予防および／または治療組成物は、テトラゾール基を有する化合物を含む組成物である。本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、特に、腎障害、糖尿病合併症（腎症、神経障害、網膜症、白内障等）、動脈硬化、透析合併症である透析アミロイドーシス、腹膜透析患者における腹膜硬化症、中枢神経疾患であるアルツハイマー病、ピック病およびパーキンソン病、リウマチ性関節炎、日光弾性線維症、老化等の予防および／または治療に有用である。本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物を予防剤または治療剤として用いる場合、テトラゾール基を有する化合物を、そのままあるいは水に希釈する等の各種処理を施して使用することができる。あるいはテトラゾール基を有する化合物を、医薬品、医薬部外品等に配合して使用することができる。この場合の配合量は病態や製品に応じて適宜選択される。通常全身投与製剤の場合

合には、0.001～50重量%、特に0.01～10重量%とすることができ、0.001重量%より少ないと満足する予防または治療作用が認められない可能性がある。また、5重量%を越えると製品そのものの安定性や香味等の特性が損なわれる可能性があるので好ましくない。

本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物に含まれるテトラゾール基を有する化合物は、製剤学的に許容される塩として製剤中に含有されていてもよい。薬剤学的に許容される塩としては、例えば無機塩基、有機塩基等の塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩等が挙げられる。無機塩基としては、例えば、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属、アルミニウム、アンモニウム等が挙げられる。有機塩基としては、例えば、エタノールアミン等の第一級アミン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン等の第二級アミン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、トリエタノールアミン等の第三級アミン等が挙げられる。無機酸としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等が挙げられる。有機酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられる。塩基性アミノ酸としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチン等が挙げられる。酸性アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

また、本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、テトラゾール基を有する化合物に加え、カルボニルストレスの改善作用が知られている公知の成分を組み合わせることができる。具体的には、アミノグアニジン、ピリドキサミン誘導体、OPB-9195、ビグアナイド化合物、架橋形成阻害薬、アマドリ化合物を分解する酵素、GSH、システイン、アセチルシステイン、ビタミンE、ユビキノール、アルドー

ス還元酵素阻害薬、カルボニル化合物トラップ剤等の薬物と併用あるいは配合することができる。これらの成分との組み合わせにより本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物の作用を高めることができる。また、当業者は適切に、テトラゾール基を有する化合物の成分を失活化または分解する物質を同定し、これを阻害する物質を選択し、これを併用あるいは配合し、組成物中の有効成分の安定化を図ることができる。

本発明の医薬組成物の投与方法として、経口投与、静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与等が適宜選択できる。一方本発明の組成物は、投与方法に応じて、種々の製剤として用いることができる。以下に、各製剤について記載する。本発明において用いられる剤型はこれらに限定されるものではなく、医薬製剤分野において通常用いられる各種製剤として用いることができる。

<全身投与製剤>

蛋白修飾物が関与する病態に対する予防薬または治療薬として用いる場合には、テトラゾール基を有する化合物の経口投与量は、 $0.3 \text{ mg/kg} \sim 300 \text{ mg/kg}$ の範囲が好ましく、より好ましくは $1 \text{ mg/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ である。全身投与を行う場合、特に静脈内投与の場合には、性別、年齢、または体型等により変動があるが、有効血中濃度が $2 \mu\text{g/mL} \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 、より好ましくは $5 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ の範囲となるように投与することができる。

経口投与を行う場合の剤型として、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤およびシロップ剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。また、口腔内局所投与を行う場合の剤型として、咀嚼剤、舌下剤、バツカル剤、トローチ剤、軟膏剤、貼布剤、液剤等があり、適宜選択することができる。また、それら製剤について徐放化、安定

化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施すことができる。

上記の各剤型について、公知のドラッグデリバリーシステム（DDS）の技術を採用することができる。本明細書に言うDDS製剤とは、徐放化製剤、局所適用製剤（トローチ、バッカル錠、舌下錠等）、薬物放出制御製剤、腸溶性製剤および胃溶性製剤等、投与経路、バイオアベイラビリティ、副作用等を勘案した上で、最適の製剤形態にした製剤を言う。

DDSの構成要素には基本的に薬物、薬物放出モジュール、被包体および治療プログラムから成り、各々の構成要素について、特に放出を停止させた時に速やかに血中濃度が低下する半減期の短い薬物が好ましく、投与部位の生体組織と反応しない被包体が好ましく、さらに、設定された期間において最良の薬物濃度を維持する治療プログラムを有するのが好ましい。薬物放出モジュールは基本的に薬物貯蔵庫、放出制御部、エネルギー源および放出孔または放出表面を有している。これら基本的構成要素は全て揃っている必要はなく、適宜追加あるいは削除等を行い、最良の形態を選択することができる。

DDSに使用できる材料としては、高分子、シクロデキストリン誘導体、レシチン等がある。高分子には不溶性高分子（シリコーン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、エチルセルロース、セルロースアセテート等）、水溶性高分子およびヒドロキシルゲル形成高分子（ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート架橋体、ポリアクリル架橋体、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、水溶性セルロース誘導体、架橋ポロキサマー、キチン、キトサン等）、徐溶解性高分子（エチルセルロース、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステル等）、胃溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースナトリウム、マクロゴール、ポリビニルピロリドン、メタアクリル酸ジメチルアミノエチル・メタアクリル酸メチルコポリマー等）、腸溶性高分子（ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸フタルセルロース、ヒド

- 21 -

ロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、アクリル酸系ポリマー等）、生分解性高分子（熱凝固または架橋アルブミン、架橋ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、ポリシアノアクリレート、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ β ヒドロキシ酢酸、ポリカプロラクトン等）があり、剤型によって適宜選択することができる。

特に、シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレンービニルアルコール共重合体、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルは薬物の放出制御に使用できる。セルロースアセテートは浸透圧ポンプの材料として使用できる。エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロースは徐放性製剤の膜素材として使用できる。ポリアクリル架橋体は口腔粘膜あるいは眼粘膜付着剤として使用できる。

また、製剤中にはその剤形（経口投与剤、注射剤、座剤等の公知の剤形）に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤等の添加剤を加えることができる。

これら各添加剤について、それぞれ具体例を挙げて例示するが、これらに特に限定されるものではない。溶剤としては、精製水、注射用水、生理食塩液、ラッカセイ油、エタノール、グリセリン等を挙げることができる。

賦形剤としては、デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトール等を挙げることができる。コーティング剤としては、白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロースおよび上記記載した高分子等を挙げることができる。

基剤としては、ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤等を挙げることができる。結合剤としては、デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴム等の天然高分子化合物、ポリビニルピロリドン等の合成高

- 2 2 -

分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチ等を挙げることができる。滑沢剤としては、ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、小麦デンプン、マクロゴール、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。

崩壊剤としては、デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架橋体、低置換型ヒドロキシプロピルセルロース等を挙げることができる。

溶解補助剤としては、シクロデキストリン、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。懸濁化剤としては、アラビアゴム、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、クエン酸、各種界面活性剤等を挙げることができる。

粘稠剤としては、カルメロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム等を挙げることができる。

乳化剤としては、アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチルセルロース、各種界面活性剤、レシチン等を挙げることができる。

安定剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性物質等を挙げることができる。緩衝剤としては、リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸等を挙げることができる。

等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖等を挙げることができる。無痛化剤としては、塩酸プロカイン、リドカイン、ベンジルアルコール等を挙げることができる。

保存剤としては、安息香酸およびその塩類、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、逆性石けん、ベンジルアルコール、フェノール、チロメサール等を挙げることができる。矯味剤としては、白糖、サッカリン、カンゾウエキ

ス、ソルビトール、キシリトール、グリセリン等を挙げることができる。芳香剤としては、トウヒチンキ、ローズ油等を挙げることができる。着色剤としては、水溶性食用色素、レーキ色素等を挙げることができる。

上記したように、医薬品を徐放化製剤、腸溶性製剤または薬物放出制御製剤等のDDS製剤化することにより、薬物の有効血中濃度の持続化、バイオアベイラビリティの向上等の効果が期待できる。なお有効成分であるテトラゾール基を有する化合物は、生体内で失活化または分解され、所望の効果が低下または消失する可能性がある。従って、有効成分を失活化または分解する作用を阻害する物質を本発明の治療組成物と併用することにより、有効成分の効果をさらに持続させることができる。失活化または分解する作用を阻害する物質は、製剤中に配合してもよく、または別々に投与してもよい。当業者は適切に、テトラゾール基を有する化合物の成分を失活化または分解する物質を同定し、これを阻害する物質を選択し、配合あるいは併用することができる。

製剤中には、上記以外の添加物として通常の組成物に使用されている成分を用いることができ、これらの成分の添加量は、本発明の効果を妨げない範囲で通常量とすることができる。

また、本発明のテトラゾール基を有する化合物は、腹膜透析における蛋白修飾物質による障害、即ち蛋白修飾物質の生成を抑制する方法、ならびにこの方法を実現するための透析液や薬剤に利用できる。本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、腹膜透析に於いて蛋白修飾物の生成を抑制するため、または血液透析に於いて蛋白修飾物の生成を抑制するためのものであってもよい。本発明の腹膜透析液は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを含んでいることを特徴とし、本発明の血液透析液は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを含んでいることを特徴とする。本発明の液体試料のカルボニル化合物含有量を低減させる方法は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを液体試料と接触させる工程を含んでいることを特徴とする。また、本発明の蛋

白修飾物の生成抑制方法は、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを、患者血液または腹膜透析液と接触させる工程を含んでいることを特徴とする。

透析における蛋白修飾物質とは、腹膜透析または血液透析を受ける患者に由来するカルボニル化合物により生成される蛋白修飾物質、および腹膜透析液または血液透析液自体に由来するカルボニル化合物により生成される蛋白修飾物質等が対象となる。

本発明におけるテトラゾール基を有する化合物を添加する腹膜透析液または血液透析液の組成は、公知のものでよい。一般的な腹膜透析液は、浸透圧調節剤（グルコース等）、緩衝剤（乳酸、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸等の有機酸、炭酸水素ナトリウム等）、無機塩類（ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、塩素イオン等）等で構成されている。

テトラゾール基を有する化合物を添加した腹膜透析液または血液透析液は、そのまま密封して加熱滅菌することができる。そうすることによって、加熱滅菌処理時または保存時に伴う、これら主成分からの蛋白修飾物の生成を抑制することができる。また、第1室および第2室からなる分画された容器に腹膜透析等の液を収容し、第1室に還元糖を収容し、第2室にテトラゾール基を有する化合物を収容し、使用直前に混合しても良い。透析液にアミノ酸が含まれる場合には、当業者は適宜第3室を設ける等、最良の形態をとることができる。

腹腔内または血管内に投与された後は、テトラゾール基を有する化合物が蛋白修飾物の生成を抑制するため、腹膜硬化等の副作用を軽減できる。さらに、その他の病態（糖尿病合併症等）の予防・治療にも効果を発揮することが期待できる。透析液には、本発明のテトラゾール基を有する化合物の他に、公知のアミノグアニジン等の薬物を混合して用いることができる。また、粉末型透析剤にも応用可能である。

一方、テトラゾール基を有する化合物を固定化した担体を腹膜透析液または血液透析時などの体外循環血液に接触させることにより、蛋白修飾物質の生成を抑制することもできる。接触させる方法としては、種々の形態が考えられる。例えば、テトラゾール基を有する化合物を内部に固定化した容器、あるいは粒子や繊維のような担体に固定化したテトラゾール基を有する化合物を含む容器に透析液を収容することができる。また、テトラゾール基を有する化合物を固定化したビーズ状や繊維状等の担体、またはテトラゾール基を有する化合物をカラムに充填して蛋白修飾物生成抑制用カートリッジとし、このカートリッジに腹膜透析液または血液を接触させた後に生体内に導入することもできる。

本発明の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジは、上記蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せが充填されたことを特徴とする。この蛋白修飾物生成抑制用カートリッジは、腹膜透析用または血液透析用として適しているが、これらの用途に特に限定されない。また、本発明のカルボニル化合物含有量を低減させた腹膜透析液の調製方法は、上記蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに腹膜透析液を導入する工程と、該カートリッジから腹膜透析液を回収する工程とを含むことを特徴とする。カルボニル化合物含有量を低減させた血液透析液の調製方法は、上記蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに血液透析液を導入する工程と、該カートリッジから血液透析液を回収する工程とを含むことを特徴とする。

また、テトラゾール基を有する化合物を固定化した担体が充填された血液バッグに採血した血液を入れ、この中で血液の蛋白修飾物の生成を抑制することもできる。さらに、保存中に生成・蓄積する蛋白修飾物を抑制することができる。血液は、全血でなくても、血漿を分離した後、血漿を処理しても良い。処理された血液は患者に戻されるか、必要に応じて血液バッグ中に保存することもできる。さらに、テトラゾール基を有する化合物を固定化した担体と血液との接触は、血液透析や血液濾過、血液濾過透析、血液吸着、血漿分離を含む血液浄化の過程、献血等の過程で行うことができ、血液の保存にも使用できる。

本発明におけるテトラゾール基を有する化合物を固定化する担体としては、人体に対して無害なもの、腹膜透析液等に直積接触する材料として安全性および安定性を有するものであれば特に制限されない。本発明における担体は、本発明の何れかの蛋白修飾物生成抑制剤またはそれらの組合せを固定化するための不溶性の担体をいう。本発明の蛋白修飾物生成抑制組成物は、このように担体に固定化されていてもよい。本発明における担体として、例えば、合成または有機高分子化合物や、ガラスビーズ、シリカゲル、アルミナ、活性炭などの無機材料、およびこれらの表面に多糖類、合成高分子などをコーティングしたものなどが挙げられる。

高分子化合物からなる担体としては、例えば、ポリメチルメタクリレート系重合体、ポリアクリロニトリル系重合体、ポリスルホン系重合体、ビニル系重合体、ポリオレフィン系重合体、フッ素系重合体、ポリエステル系重合体、ポリアミド系重合体、ポリイミド系重合体、ポリウレタン系重合体、ポリアクリル系重合体、ポリスチレン系重合体、ポリケトン系重合体、シリコン系重合体、セルロース系重合体、キトサン系重合体などが挙げられる。

具体的には、アガロース、セルロース、キチン、キトサン、セファロース、デキストラン等の多糖類およびそれらの誘導体、ポリエチレン、ポリエステル、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリプロピレン、ポリビニルアルコール、ポリアリルエーテルスルホン、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリカーボネート、アセチル化セルロース、ポリアクリロニトリル、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、ポリアセタール、シリコン樹脂、フッ素樹脂、ポリウレタン、ナイロン、ポリエーテルウレタン、ポリアクリルアミド、それらの誘導体などが挙げられる。

これらの高分子材料は単独、あるいは2種以上を組み合わせで使用することができる。2種以上組み合わせる場合は、そのうち少なくとも1種にテトラゾール基を有する化合物が固定化される。固定化されるテトラゾール基を有する化合物

は、単独で固定化するほか、2種以上を固定化してもよい。また、上記の高分子材料は単一のポリマーとして用いられるほか、異種のポリマーとの共重合体とすることもできる。さらに、適当な改質剤を添加したり、放射線架橋、過酸化物架橋などの変性処理を施しても良い。さらに、ガラス、金属等が挙げられる。これら担体は、公知の修飾、改質または変性などを施すことができる。

不溶性担体の形状としては、例えば膜状、多孔形状、中空糸状、不織布状、トレイ状、ハニカム形状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。これらの担体は、厚さ、表面積、太さ、長さ、形状、および／または大きさを種々変えることにより、透析液等との接触面積を制御することができる。さらに、透析液等を収容する容器の内壁や、透析液循環回路の内部などにテトラゾール基を有する化合物を固定することもできる。

上記担体にテトラゾール基を有する化合物を固定化するには、公知の方法、例えば、物理的吸着法、生化学的特異結合法、イオン結合法、共有結合法、クラフト化などを用いればよい。また、必要によりスペーサーを担体とテトラゾール基を有する化合物の間に導入しても良い。テトラゾール基を有する化合物に毒性がある場合など、担体からの溶出が問題となる場合には、溶出量をできるだけ少なくするためにテトラゾール基を有する化合物は担体に共有結合で固定化されていることが好ましい。

テトラゾール基を有する化合物を担体に共有結合するには、担体に存在する官能基を用いればよい。官能基としては、例えば、水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、ヒドロキシル基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、サクシニルイミド基等が挙げられるが、これらに限定されない。共有結合の例としてエステル結合、エーテル結合、アミノ結合、アミド結合、スルフィド結合、イミノ結合、ジスルフィド結合等が挙げられる。

本発明に基づくテトラゾール基を有する化合物を固定化した担体の滅菌は、公知の滅菌法から、テトラゾール基を有する化合物や担体などの種類により適当な

滅菌法が選択される。テトラゾール基を有する化合物を充填したカートリッジを用意し、これを腹膜透析液等を収容した容器に接続した状態で両者を同時に滅菌することもできる。

透析液等と接触するテトラゾール基を有する化合物が少ないと、透析液中の蛋白修飾物生成を効果的に抑制することができなくなるケースが予想される。一般には透析液中の蛋白修飾物生成量を予め予測することは困難なので、患者に対する安全性を保証できる範囲内でできるだけ多量のテトラゾール基を有する化合物が活性を維持できるようにするのが効果的である。テトラゾール基を有する化合物の用量は、担体へのテトラゾール基を有する化合物の固定化量、またはテトラゾール基を有する化合物が固定化された担体の使用量を変更して調製することができる。

適当な混注用コネクターを装備した透析回路に、テトラゾール基を有する化合物を注入することもできる。また、テトラゾール基を有する化合物を直接腹腔内に注入して、腹腔内で腹膜透析液と混合することもできる。また、腹膜透析液を患者へ注入する前、または腹腔内貯留中に、テトラゾール基を有する化合物を静脈内注射することにより、蛋白修飾物の生成を効果的に抑制することもできる。

透析液等は、適当な密閉容器に充填し、滅菌処理する。滅菌処理には高圧蒸気滅菌や熱水滅菌などの加熱滅菌が有効である。この場合、高温で有害物質を溶出せず、滅菌後も輸送に耐える強度を備えた容器を用いる。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエステル、エチレン酢酸ビニル共重合体などからなる可撓性プラスチックバッグが挙げられる。また、外気の影響による液の劣化を避けるために、透析液等を充填した容器をさらにガスバリアー性の高い包装材で包装しても良い。

高圧加熱滅菌を含む加熱滅菌により滅菌処理を行う場合、用いられるテトラゾール基を有する化合物が加熱などの処理に対して十分安定であるならば、透析液配合時に該テトラゾール基を有する化合物を予め添加してから、加熱滅菌操作を

行うこともできる。用いるテトラゾール基を有する化合物が加熱滅菌に安定でない場合は、加熱を要しない滅菌法を用いることもできる。この様な滅菌法には、例えば濾過滅菌などがある。例えば、孔径0.2 μm 程度のメンブランフィルターを備えた精密濾過器を用いて濾過することにより滅菌することができる。濾過滅菌された透析液は、可撓性プラスチックバックなどの容器に充填された後、密封される。また、予め加熱滅菌した腹膜透析液等に、後でテトラゾール基を有する化合物を添加しても良い。

添加する時期は特に限定されない。液を滅菌後あるいは滅菌前にテトラゾール基を有する化合物を添加しても良いし、透析直前または同時に添加しても良いし、透析回路中にテトラゾール基を有する化合物を固定化した担体を設置しても良いし、透析液を注した後に直接腹膜に注入しても良い。

本発明の腹膜透析液は、現行の腹膜透析液や血液透析液と同様の透析処理に利用される。すなわち、腹膜透析の場合にあつては、透析患者の腹腔内に本発明による腹膜透析液を適量注入し、腹膜を通過して生体内の低分子量成分を腹膜透析液内に移行させる。腹膜透析液は間欠的に循環させ、患者の症状に応じて透析を継続する。このとき、テトラゾール基を有する化合物は透析液内または生体内での蛋白修飾物の生成を抑制する。クレアチニンや無機塩類、あるいは塩素イオン等の透析成分とともに、カルボニル化合物も血中や腹膜内から腹膜透析液中へ移行する。ゆえに、蛋白修飾物による生体への悪影響が減少される。

テトラゾール基を有する化合物は透析液のみに使用できるのではなく、栄養輸液、電解質輸液等、あらゆる液剤に利用できる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図1は、テトラゾール基を有する化合物(5mM)による、血液透析患者の血清中

- 30 -

のペントシジン生成抑制効果を示す図。縦軸はペントシジンの生成量(nmol/ml)を、横軸は化合物の種類を示す。

図2は、テトラゾール基を有する化合物による、アラビノース由来のペントシジン生成抑制効果を示す図。縦軸はペントシジンの生成量(nmol/ml)を、横軸は化合物の種類と添加濃度(0mM、0.8mM、2mM、および5mM)を示す。

図3は、テトラゾール基を有する化合物(5mM)の、カルボキシメチルリジンの生成抑制効果をスクリーニングした結果を示す図。縦軸はカルボキシメチルリジンの生成量(nmol/ml)を、横軸は化合物の種類を示す。

図4は、テトラゾール基を有する化合物(5mM)による、糖尿病患者血漿中のペントシジン生成抑制効果を示す図。縦軸はペントシジンの生成量(nmol/L)を、横軸は化合物の種類を示す。

図5は、テトラゾール基を有する化合物による、糖由来フリーラジカル(カーボンセンターラジカル)生成抑制効果を示す図。縦軸は糖由来フリーラジカルの生成率(%)を、横軸は化合物の種類を示す。

図6は、テトラゾール基を有する化合物による、ヒドロキシラジカル生成抑制効果を示す図。縦軸はヒドロキシラジカルの生成率(%)を、横軸は化合物の種類を示す。

図7は、テトラゾール基を有する化合物による、ピリドキサール-5'-リン酸との結合能を示す図。縦軸はピリドキサール-5'-リン酸の残存率(%)を、横軸は時間を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

< AGEs 生成抑制剤のスクリーニング (1) >

種々のテトラゾール基を有する化合物について、AGEs 構造体のひとつであ

るペントシジンの生成量を指標に抑制剤のスクリーニングを以下の方法で行った。

(A) 血液透析 (HD) 患者血清中のペントシジン生成抑制効果

血液透析患者の透析前の血漿を同意の下に透析前に採取し、濾過滅菌し試料とした。血漿 (最終容量0.5ml) に各化合物を加えて37℃で1週間反応を行い、ペントシジンの生成量を指標に蛋白質の修飾反応を抑制する強さを評価した。化合物は全てジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して100mM溶液とし、反応液中での化合物濃度が5mMとなるように添加した。100mM溶液が調製できない場合は、溶媒量を2倍量、次いで4倍量として溶解した。この場合 (50mM溶液あるいは25mM溶液) は、添加量を反応液全量の1/25容量とした (反応液中の化合物濃度は、前者は2mM、後者は1mMとなる)。尚、溶媒量を規定の4倍量まで増やしても化合物が溶媒に溶けない場合は、そのまま試験に供した。

抑制効果の評価は、各化合物と同時に反応させた陽性対照 (アミノグアニジン) と比較することにより行った。

ペントシジンの測定は、以下のようにして行った。蛋白質上に生成したペントシジンを遊離させるため、反応後の試料50 μ Lに10%トリクロロ酢酸50 μ Lを加え、遠心して蛋白質を沈澱させて回収した。回収した蛋白質を300 μ Lの5%トリクロロ酢酸で洗浄し、乾燥させた後、6N-HClを100 μ L添加し110℃、16時間加水分解を行った。蛍光検出器を用いたHPLC (ODS C18、4.6 \times 250mm、335nm、385nm) を用い、0.1%トリフルオロ酢酸添加蒸留水/0.08%トリフルオロ酢酸添加80%アセトニトリルを移動相とするグラジエント法 (30分間、1.0ml/分) によりペントシジンの生成量 (nmol/l) を測定した (Miyata, T. et al.: J. Am. Soc. Nephrol., 7, 1198-1206, 1996、Miyata, T. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 2353-2358, 1996)。

結果を表1および図1に示す。各化合物はいずれもペントシジン産生抑制作用を示した。テトラゾール、フェニルテトラゾール、プロモフェニルテトラゾールおよびロサルタンは、陽性対象であるアミノグアニジンと同等のペントシジン抑

- 3 2 -

制効果を示した。また、バルサルタン、カンデサルタンシレキセチルおよびオルメサルタンは、アミノグアニジンを凌ぐ蛋白修飾物抑制効果を示した。

表 1

| 化 合 物 | 濃 度 | ペントシジン生成量(nmol/l) |
|----------------------|------|-------------------|
| DMSO (陰性対象) | | 1.346 |
| アミノグアニジン (陽性対象) | 5 mM | 0.842 |
| テトラゾール | 5 mM | 0.955 |
| 5-フェニルテトラゾール | 5 mM | 0.689 |
| 5-(2-プロモフェニル)-テトラゾール | 5 mM | 0.762 |
| バルサルタン | 5 mM | 0.279 |
| ロサルタン | 5 mM | 0.720 |
| カンデサルタンシレキセチル | 5 mM | 0.550 |
| オルメサルタン | 5 mM | 0.443 |

(B) アラビノース由来のペントシジン抑制効果

アラビノースに由来するペントシジンの抑制効果を以下のようにして検討した。
 蛋白質 (ウシ血清アルブミン:BSA) 30mg/ml、糖 (L(+))アラビノース) 10mM、
 化合物 (最終濃度0.8mM、2 mM、5 mM)、およびリン酸ナトリウム緩衝液
 (pH7.4、0.1M) を含む反応系 (最終容量0.5ml) にを加えて37℃で1週間反応
 を行い、ペントシジンの生成量を (A) に準じ操作し、測定した。

結果を表 2 および図 2 に示す。各化合物はいずれも濃度依存的にアラビノース
 に由来するペントシジンの産生を抑制した。

表 2

| 化 合 物 | 濃 度 | ペントシジン生成量(nmol/l) |
|-----------------|-------|-------------------|
| DMSO (陰性対象) | | 8.749 |
| アミノグアニジン (陽性対象) | 0.8mM | 5.860 |
| | 2 mM | 4.588 |
| | 5 mM | 2.599 |
| バルサルタン | 0.8mM | 5.139 |
| | 2 mM | 2.843 |
| | 5 mM | 1.501 |
| オルメサルタン | 0.8mM | 5.910 |
| | 2 mM | 4.210 |
| | 5 mM | 2.300 |

- 33 -

< AGE s 生成抑制剤のスクリーニング (2) >

種々のテトラゾール基を有する化合物について、AGE s 構造体のひとつであるカルボキシメチルリジン (CML) の生成量を指標に抑制剤のスクリーニングを以下の方法で行った。

血液透析患者の透析前の血漿を同意の下に透析前に採取し、濾過滅菌し試料とした。血漿 (最終容量0.5ml) に各化合物を加えて37℃で1週間反応を行い、CMLの生成量を指標に蛋白質の修飾反応を抑制する強さを評価した。化合物は全てジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して100mM溶液とし、反応液中での化合物濃度が5mMとなるように添加した。100mM溶液が調製できない場合は、溶媒量を2倍量、次いで4倍量として溶解した。この場合 (50mM溶液あるいは25mM溶液) は、添加量を反応液全量の1/25容量とした (反応液中の化合物濃度は、前者は2mM、後者は1mMとなる)。尚、溶媒量を規定の4倍量まで増やしても化合物が溶媒に溶けない場合は、そのまま試験に供した。

CMLの測定は、以下のように行った。試料をアルカリの条件下、水素化ホウ素ナトリウムにより室温で4時間還元し、続いてトリクロロ酢酸を加えて蛋白を沈殿させた後、乾固した。内部標準物質を添加し、6Nの塩酸中で110℃、16時間加水分解を行った。加水分解溶液を乾固させ、メタノールを加えてエステル化した後、トリフルオロ酢酸無水物を添加してCML中に存在する遊離のアミノ基やカルボキシル基を*N*, *O*-trifluoroacetyl methyl esters誘導体化し、GC-MS (Hewlett-Packard model 6890 GC : 30 m HP-5MS capillary column, Hewlett-Packard model 6890 mass selective detector) を用いて分析した (Miyata, T. et al. : J. Am. Soc. Nephrol., 11, 1719-1725, 2000、Ahmed. et al. : J. Biol. Chem., 261, 4889-4894, 1986)。

結果を表3および図3に示す。各化合物はいずれも陽性対象であるアミノグアニジンと同等若しくはそれ以上のCML産生抑制効果を示した。

表3

- 3 4 -

| 化 合 物 | 濃 度 | CML生成量(nmol/l) |
|----------------------|------|----------------|
| DMSO (陰性対象) | | 7.46 |
| アミノグアニジン (陽性対象) | 5 mM | 4.24 |
| 5-フェニルテトラゾール | 5 mM | 5.26 |
| 5-(2-プロモフェニル)-テトラゾール | 5 mM | 4.85 |
| バルサルタン | 5 mM | 2.06 |
| オルメサルタン | 5 mM | 3.49 |

< AGE s 生成抑制剤のスクリーニング (3) >

糖尿病 (MD) 患者血漿中のペントシジン生成抑制効果を AGE s のひとつであるペントシジンの生成量を指標に抑制剤のスクリーニングを以下の方法で行った。糖尿病患者の血液を同意の下に採取し、試料とした。血漿 (最終容量0.5mL) に各化合物を加えて37℃で1週間反応を行い、ペントシジンの生成量を指標に蛋白質の糖化反応を抑制する強さを評価した。化合物は全てジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解して100mM溶液とし、反応液中での化合物濃度が 5 mM となるように添加した。100mM溶液が調製できない場合は、溶媒量を2倍量、次いで4倍量として溶解した。この場合 (50mM溶液あるいは25mM溶液) は、添加量を反応液全量の1/25容量とした (反応液中の化合物濃度は、前者は 2 mM、後者は 1 mMとなる)。尚、溶媒量を規定の4倍量まで増やしても化合物が溶媒に溶けない場合は、そのまま試験に供した。テスト化合物 (最終濃度 : 0.8mM、2.0mM、5.0mM) の存在下、1 mLの溶液を37℃で7日間インキュベートした。インキュベートの終了後、ペントシジンを (A) に準じ操作し、測定した。

結果を表4および図4に示す。各化合物はいずれも血漿中に生成するペントシジンの産生を抑制した。

表 4

| 化 合 物 | 濃 度 | ペントシジン生成量 (nmol/L) |
|----------------------|------|--------------------|
| DMSO (陰性対照) | | 0.306 |
| アミノグアニジン (陽性対照) | 5 mM | 0.197 |
| テトラゾール | 5 mM | 0.209 |
| 5-フェニルテトラゾール | 5 mM | 0.163 |
| 5-アミノテトラゾール | 5 mM | 0.215 |
| 5-(2-プロモフェニル)-テトラゾール | 5 mM | 0.164 |
| ロサルタン | 5 mM | 0.134 |
| カンデサルタンシレキセチル | 5 mM | 0.128 |
| オルメサルタン | 5 mM | 0.070 |

<フリーラジカル生成抑制効果のスクリーニング>

(A) 糖由来フリーラジカル (カーボンセンターラジカル) の消去効果

テトラゾール基を有する化合物について、糖由来フリーラジカル (カーボンセンターラジカル) の消去能を指標に抑制剤のスクリーニングを以下の方法で行った。

カーボンセンターラジカルの消去効果はリボースの自動酸化により生成する糖由来のフリーラジカルをそれぞれの化合物がどの程度抑制するかを測定することにより評価した。Chelex-100樹脂 (シグマ) (7g/L) で処理し、金属イオンを除去したリン酸緩衝液 (0.2M、pH 7.4) に、10mMリボース (和光純薬)、1mM N-t-butyl- α -phenylnitrone (PBN) (和光純薬) およびテスト化合物を溶解して試料溶液を調製し、100℃で75分インキュベートした (全量500 μ L)。反応溶液を室温まで冷却した後、糖由来フリーラジカルのPBNアダクトを、電子スピン共鳴装置 (日本電子製、JES-FE2XG型) を用いて測定した。

結果を表 5 および図 5 に示す。テスト化合物は、陽性対照であるアミノグアニジンに比較して糖由来フリーラジカルの生成を強く抑制する効果を示した。

- 36 -

表 5

| 化 合 物 | | ラジカル生成率(%) |
|-----------------|------|------------|
| 化合物フリー (陰性対照) | | 100 |
| アミノグアニジン (陽性対照) | 5 mM | 98.2 |
| テトラゾール | 5 mM | 65.6 |
| 5-フェニルテトラゾール | 5 mM | 81.5 |
| オルメサルタン | 5 mM | 55.1 |

(B) ヒドロキシルラジカルの消去効果

テトラゾール基を有する化合物について、ヒドロキシルラジカルの消去能を指標に抑制剤のスクリーニングを以下の方法で行った。

ヒドロキシルラジカルの消去効果はフェントン反応により生成するヒドロキシルラジカルをそれぞれの化合物がどの程度抑制するかを測定することにより評価した。その方法としては、ヒドロキシルラジカルが5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) に付加して生成するDMPO-OHが存在するテスト化合物によりどの程度抑制するかを測定することによって行った。具体的には、テスト化合物、1 mM DMPO、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA) (100 μ M)、 H_2O_2 (1 mM) を、0.2Mのリン酸緩衝液中に、順番に加え、蒸留水に溶解させた硫酸アンモニウム鉄(II)溶液を、25℃で添加することにより各試料毎にフェントン反応を開始させ (最終的濃度は50 μ M)、45秒後に、生じたDMPO-OHを電子スピン共鳴装置で測定した。

結果を表 6 および図 6 に示す。テスト化合物は、陽性対照であるアミノグアニジンに比較してヒドロキシルラジカルの生成を強く抑制した。

表 6

| 化 合 物 | | ラジカル生成率(%) |
|-----------------|------|------------|
| 化合物フリー (陰性対照) | | 100 |
| アミノグアニジン (陽性対照) | 5 mM | 81.0 |
| オルメサルタン | 5 mM | 16.6 |

- 37 -

<ピリドキサールとの反応>

従来のAGEs阻害剤は、ピリドキサールと結合し、重篤なビタミンB6欠乏症を惹起するという欠点があった。そこで、テスト化合物とピリドキサール-5'-リン酸との結合能を検討した。

ピリドキサール-5'-リン酸 (50 μ M) と試験化合物 (0.5mM) をリン酸塩緩衝食塩水 (PBS) 中、37°Cでインキュベートした。0～20時間の間でカイネティックスを測定するために、残存するピリドキサール-5'-リン酸濃度をHPLCで分析した。すなわち、一定時間後、10 μ Lの反応液をHPLCにインジェクトし、Purcil C18カラム (4.6 \times 250mm、5 μ m：ウォーターズ製) で分離後、励起波長300nm、蛍光波長400nmの条件で蛍光検出器 (RF-10A：島津製) を用いて検出した。移動相は、0.6mL/分の流速で、バッファB濃度を0%から3%まで25分間で変化させた (バッファA：0.10%トリフルオロ酢酸、バッファB：0.08%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル)。

結果を表7および図7に示す。陰性対照であるアミノグアニジンはピリドキサール-5'-リン酸塩と強く結合し、副作用の発生が予想されるのに対し、テトラゾール基を有する化合物は殆どピリドキサールとは反応しないことが示された。

表7

| 化 合 物 | ピリドキサール-5'-リン酸残存率(%) | | | |
|-----------------|----------------------|-------|-------|-------|
| | 0 | 2 | 19 | 30時間 |
| アミノグアニジン (陰性対照) | 100 | 54.4 | 0.4 | 0 |
| テトラゾール | 100 | 99.7 | 109.9 | 107 |
| 5-フェニルテトラゾール | 100 | 98.9 | 103.6 | 100 |
| 5-アミノテトラゾール | 100 | 96.5 | 96.5 | 101.5 |
| ロサルタン | 100 | 100.3 | 93.1 | 98.7 |
| テルミサルタン | 100 | 102.4 | 109.4 | 105 |
| カンデサルタンシレキセチル | 100 | 101.9 | 102.6 | 102.9 |
| オルメサルタン | 100 | 98.9 | 96.2 | 99.5 |

産業上の利用の可能性

本発明により、効果的にAGEs、ALEs等の蛋白修飾物の生成を抑制する

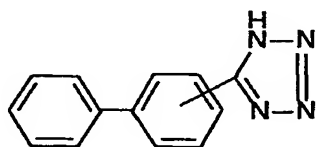
- 38 -

蛋白修飾物生成抑制剤が提供される。特に、腎障害、腎症、神経障害、網膜症、白内障等の糖尿病合併症、動脈硬化、透析合併症である透析アミロイドーシス、腹膜透析患者における腹膜硬化症、中枢神経疾患であるアルツハイマー病、ピック病、パーキンソン病、リウマチ性関節炎、日光弾性線維症、老化等に対して、予防および／または治療用の薬剤が、本発明により提供された。

本発明において蛋白修飾物生成抑制剤の有効成分として用いるテトラゾール基を有する化合物は、蛋白修飾物の生成を効果的に抑制する一方、ピリドキサール-5'-リン酸との反応性が低い。したがって本発明による蛋白修飾物生成抑制剤は、副作用であるビタミンB6欠乏症の危険が無い。これに対して、アミノグアニジンのような公知のAGEs阻害剤は、ピリドキサール-5'-リン酸との反応性を有するため、ヒトへの投与にあたっては、ビタミンB6欠乏症の危険が伴う。

請求の範囲

1. テトラゾール基を有する化合物または薬理学的に許容されるそれらの塩である蛋白修飾物生成抑制剤。
2. 化合物が（式 1）の一般式で示すビフェニルテトラゾール基を有する化合物または薬理学的に許容されるそれらの塩である請求項 1 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。



(式 1)

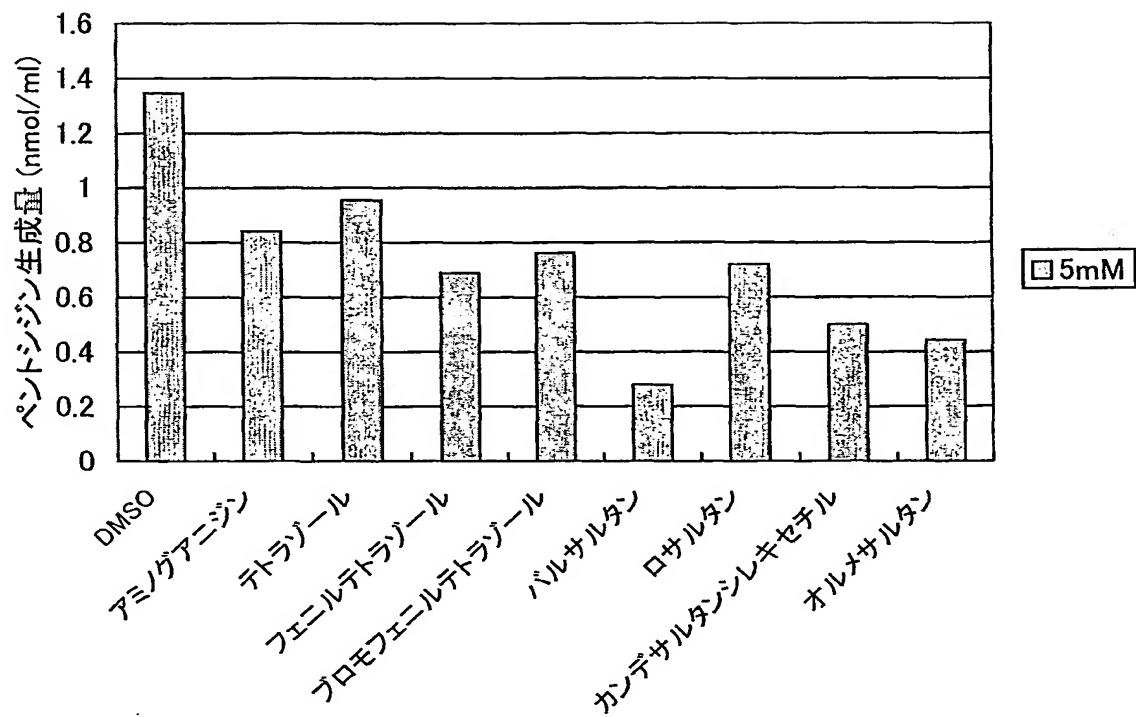
3. 化合物がアンジオテンシン受容体ブロッカーである請求項 1 または 2 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
4. アンジオテンシン受容体ブロッカーが、オルメサルタン、バルサルタン、ロサルタン、カンデサルタンシレキセチル、および薬理学的に許容されるそれらの塩で構成される群から選択された少なくとも 1 つの化合物である請求項 3 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
5. 蛋白修飾物が、糖化最終産物、および／または脂質過酸化最終産物である請求項 1 に記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
6. 蛋白修飾物が糖化最終産物である請求項 5 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
7. 糖化最終産物がペントシジンである請求項 6 記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
8. 請求項 1 乃至 10 の何れかに記載の蛋白修飾物生成抑制剤またはそれらの組合せを有効成分として含む蛋白修飾物生成抑制組成物。
9. 請求項 1 乃至 10 の何れかの蛋白修飾物生成抑制剤またはそれらの組合せが固定化された担体。
10. 請求項 9 に記載の担体を含む蛋白修飾物生成抑制組成物。
11. 腹膜透析に於いて蛋白修飾物の生成を抑制するための請求項 8 または請求

項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物。

12. 血液透析に於いて蛋白修飾物の生成を抑制するための請求項 8 または請求項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物。
13. 請求項 8 または請求項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを含む腹膜透析液。
14. 請求項 8 または請求項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを含むことを特徴とする血液透析液。
15. 請求項 8 または請求項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを液体試料と接触させる工程を含む、液体試料のカルボニル化合物含有量を低減させる方法。
16. 請求項 8 または請求項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せを、患者血液または腹膜透析液と接触させる工程を含む蛋白修飾物の生成抑制方法。
17. 請求項 8 または請求項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せが充填された蛋白修飾物生成抑制用カートリッジ。
18. 請求項 8 または請求項 10 に記載の蛋白修飾物生成抑制組成物またはそれらの組合せが充填された、腹膜透析用または血液透析用の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジ。
19. 請求項 17 に記載の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに腹膜透析液を導入する工程と、該カートリッジから腹膜透析液を回収する工程とを含むカルボニル化合物含有量を低減させた腹膜透析液の調製方法。
20. 請求項 17 に記載の蛋白修飾物生成抑制用カートリッジに血液透析液を導入する工程と、該カートリッジから血液透析液を回収する工程とを含むカルボニル化合物含有量を低減させた血液透析液の調製方法。

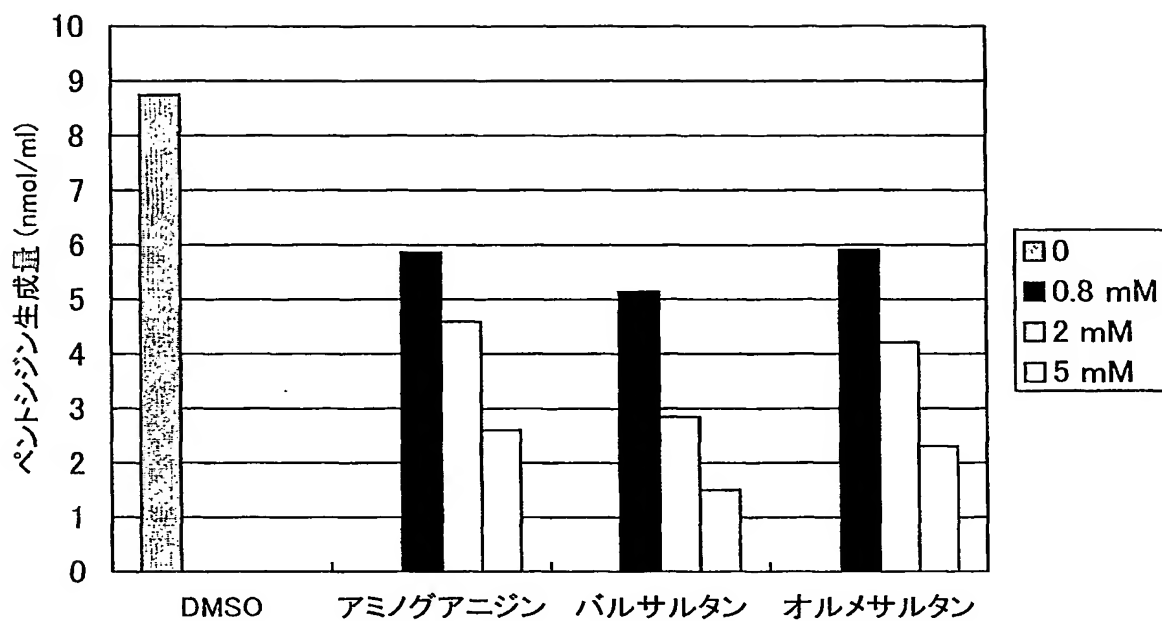
1 / 7

図 1



2 / 7

図 2



3 / 7

図 3

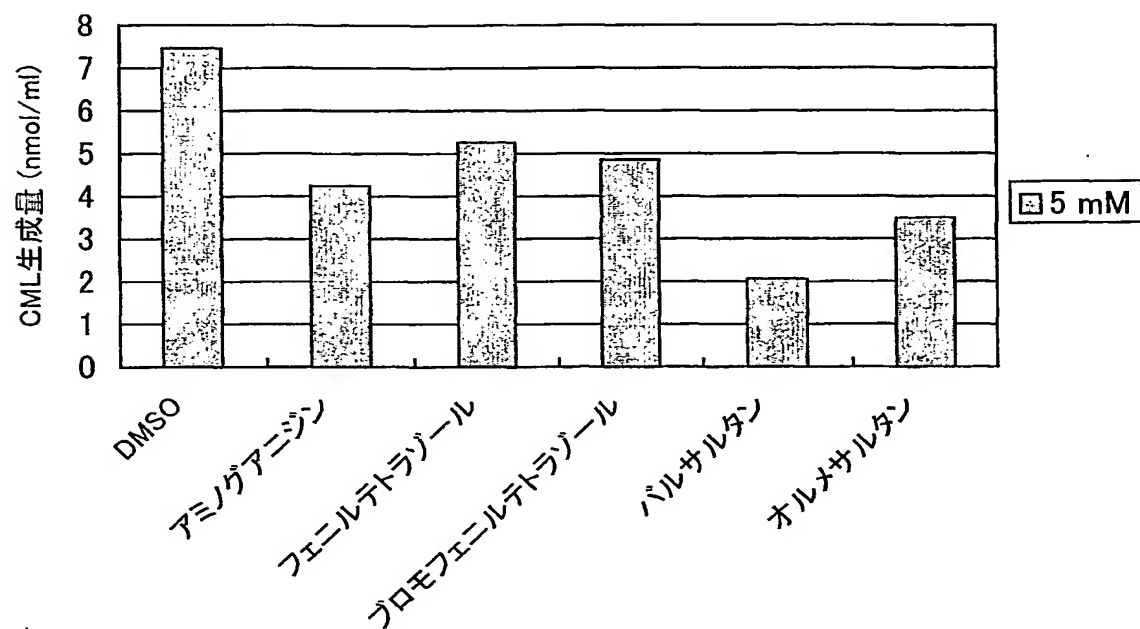


図 4

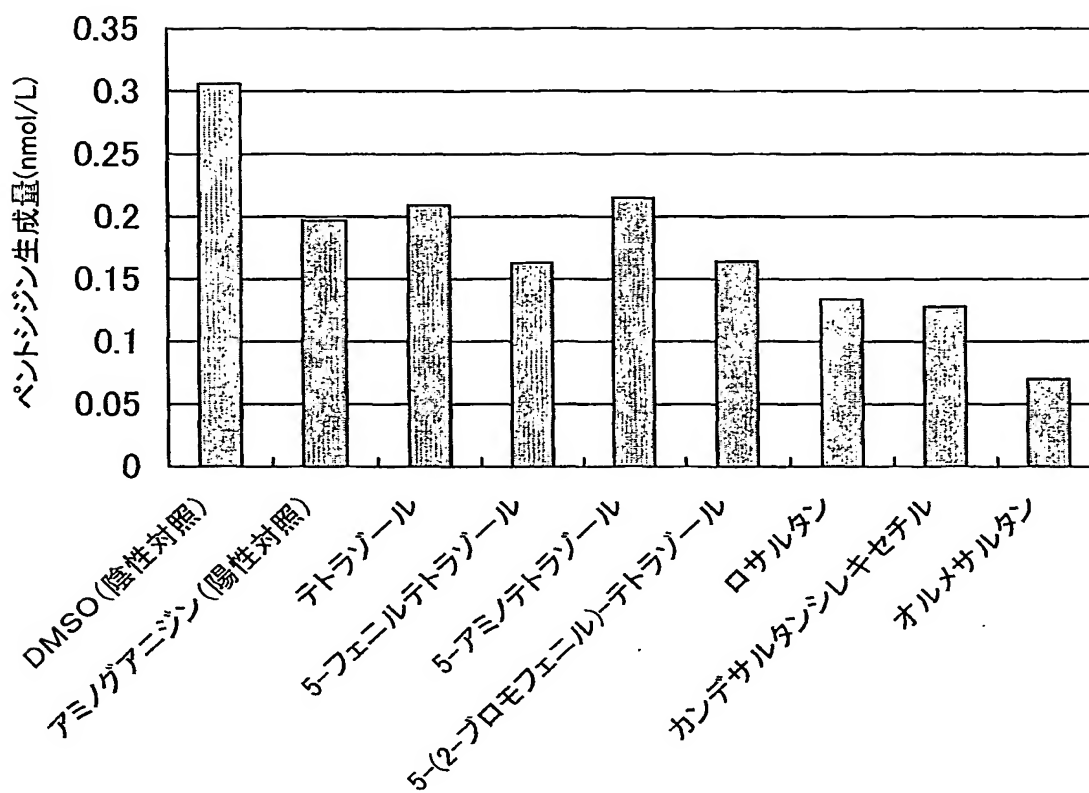
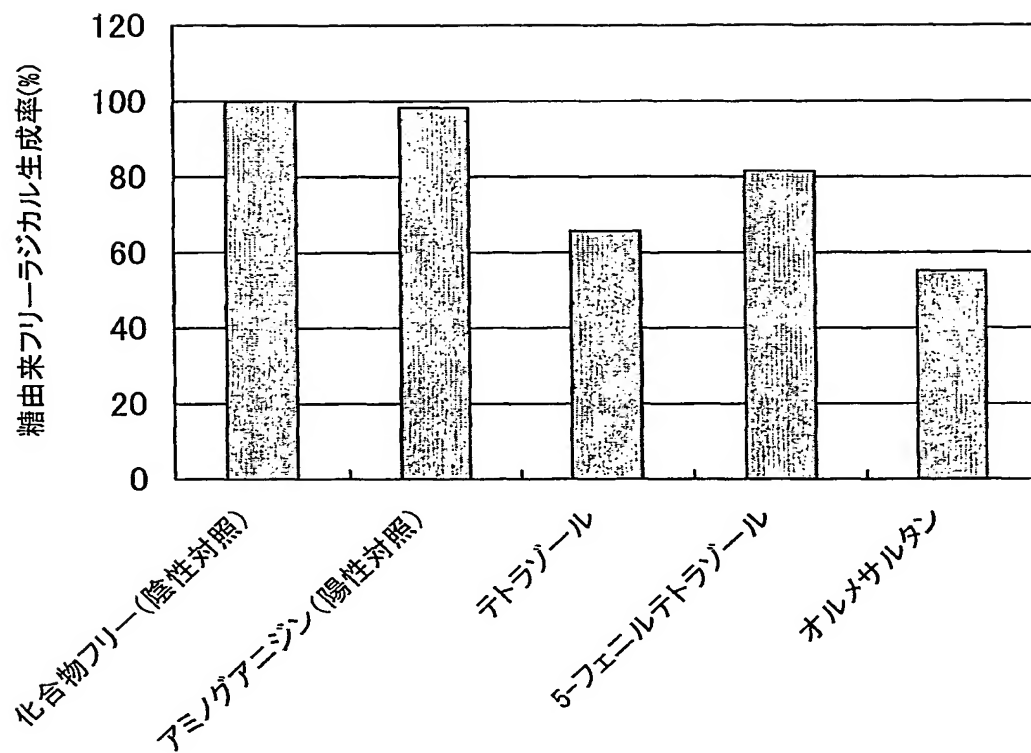


図 5



6 / 7

図 6

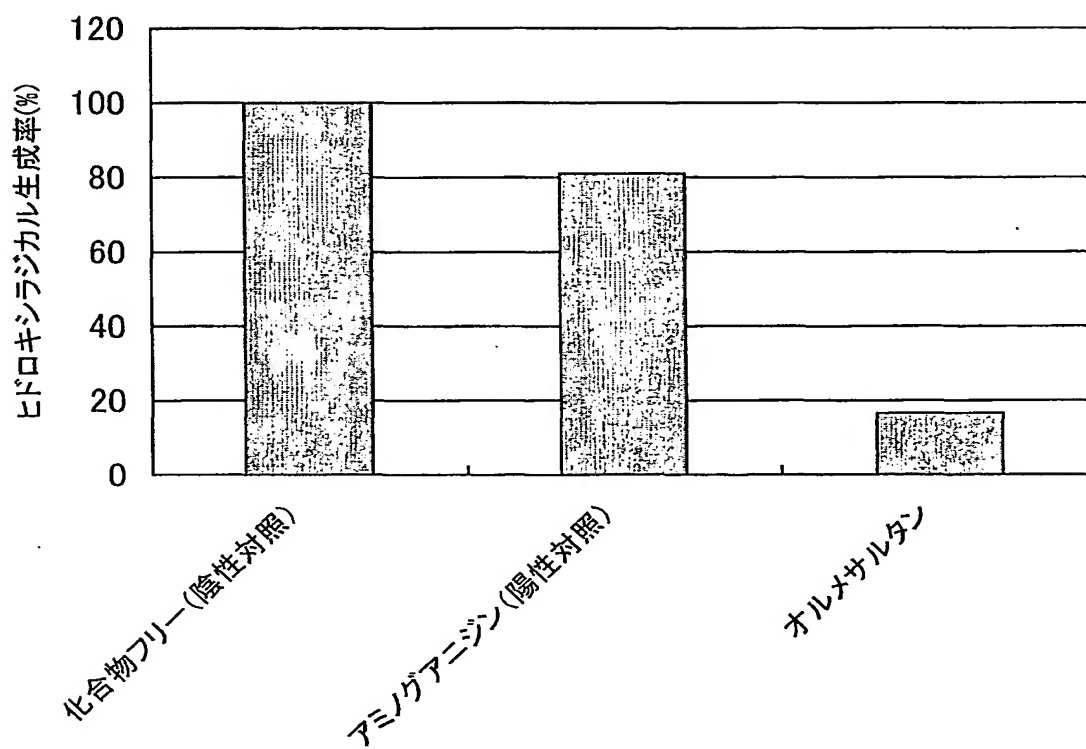
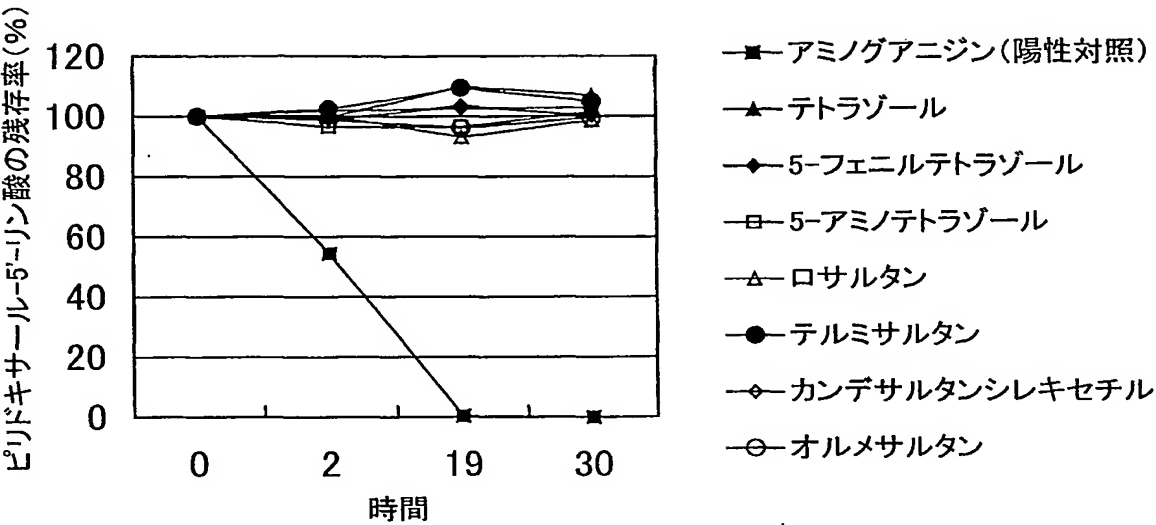


図 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03345

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K31/41, C07D257/04, 403/10//A61P3/10, 9/10, 13/12,
19/02, 25/00, 25/16, 25/28, 27/02, 27/12, 29/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K31/41, C07D257/04, 403/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | US 5252753 A (Ortho Pharmaceutical Corp.), 12 October, 1993 (12.10.93), & EP 540356 A & JP 5-279350 A | 1-15, 17-20 |
| A | WO 99/63930 A (Advanced Medicine, Inc.), 16 December, 1999 (16.12.99), & EP 1085887 A & JP 2002-517420 A | 1-15, 17-20 |
| A | WO 00/38676 A (Novartis AG), 06 July, 2000 (06.07.00), & EP 1013273 A | 1-15, 17-20 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 July, 2002 (03.07.02)

Date of mailing of the international search report
16 July, 2002 (16.07.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03345

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 16 substantially pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

| | | |
|--|--|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K31/41, C07D257/04, 403/10 // A61P3/10, 9/10, 13/12, 19/02, 25/00, 25/16, 25/28, 27/02, 27/12, 29/00, 43/00 | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K31/41, C07D257/04, 403/10 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN) | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | US 5252753 A (Ortho Pharmaceutical Corporation), 1993. 10. 12 & EP 540356 A & JP 5-279350 A | 1-15, 17-20 |
| A | WO 99/63930 A (ADVANCED MEDICINE, INC.), 1999. 12. 16 & EP 1085887 A & JP 2002-517420 A | 1-15, 17-20 |
| A | WO 00/38676 A (NOVARTIS AG), 2000. 07. 06 & EP 1013273 A | 1-15, 17-20 |
| <input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 03. 07. 02 | 国際調査報告の発送日 16.07.02 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 弘 實 謙二 | 4 P 7433 |
| | 電話番号 03-3581-1101 内線 3492 | |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 16 は、実質的に治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iV) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。